A. Scholl * und **J. H. Schröder.** **. — Biochemische Untersuchungen über die genetische Differenzierung mittelamerikanischer Zahnkarpfenarten (Cyprinodontiformes, Poeciliidae).
(Mit 2 Tabellen) [1]

* Zoologisches Institut der Universität Bern, CH-3012 Bern, Sahlistrasse 8
** Institut für Biologie, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, D-8042 Neuherberg/München, Ingolstädter Landstr. 1

Rosen und Bailey (1963) legten kürzlich eine systematische Revision der Poeciliiden vor, die sich auf verschiedene meristische Merkmale, insbesondere aber auf die morphologische Struktur des Gonopodiums stützt. In dieser Revision werden einige bisher anerkannte Gattungen aufgelöst. Dies betrifft auch Zahnkarpfengattungen, die durch die Aquaristik weltweite Verbreitung erfahren haben und ebenso in der wissenschaftlichen Zoologie als Objekte biologischer Grundlagenforschung eine besondere Stellung einnehmen (Kosswig, 1973). So wird die Gattung *Platypoecilus* (Platies) aufgehoben und mit der Gattung *Xiphophorus* (Schwertträger) vereinigt, ebenso werden die Gattungen *Lebistes* (Guppies) und *Mollienesia* (Mollies) eingezogen und in der Gattung *Poecilia* zusammengefasst. Diese Revision ist umstritten geblieben (Zander, 1967; Schröder, 1969).

Der Grad genetischer Differenzierung zwischen nahe verwandten Spezies lässt sich heute mit biochemisch-genetischen Methoden erfassen, insbesondere durch einen Vergleich der elektrophoretischen Mobilitäten homologer Enzymproteine. Dieser Methode liegen folgende Überlegungen zugrunde: Die elektrophoretische Mobilität eines Proteines ergibt sich unter konstanten Versuchsbedingungen aus dessen genetisch bedingter Struktur. Infolgedessen lassen sich Mutationen an den Enzymloci mit hoher Wahrscheinlichkeit anhand veränderter elektrophoretischer Mobilitäten der von ihnen codierten Proteine erkennen. Beim Vergleich verschiedener Spezies kann somit der Anteil elektrophoretisch identischer Proteine als ein Äquivalent der durch Mutationen nicht oder elektrophoretisch nicht feststellbar veränderten Loci dienen. Dieser Koeffizient genetischer Ähnlichkeit erlaubt, die genetische Differenzierung auch jenseits der Artgrenzen quantitativ zu erfassen. Bei congenerischen Spezies weisen noch etwa 50% der Enzyme gleiche elektrophoretische Mobilität auf, jenseits der Gattungsgrenzen hingegen ist der Anteil identischer Proteine äusserst gering.

[1] Mit finanzieller Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds (Kredit Nr. 3.772.72) und der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung. Wir danken Herrn cand. phil.-nat. R. Rothen, Bern und Herrn Dr. S. Holzberg, Neuherberg, für ihre Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen.

SCHOLL und ANDERS (1973) zeigten nun durch elektrophoretische Untersuchungen, dass der Grad genetischer Differenzierung zwischen Schwertträgern und Platies äusserst gering ist und dass diese Zahnkarpfen im Sinne der Revision der Zahnkarpfensystematik auch aus biochemisch-genetischer Sicht als congenerische Spezies betrachtet werden müssten. So betrug bei einem Vergleich von neun Spezies und Subspezies der mittlere Anteil elektrophoretisch unterscheidbarer Proteine zwischen Schwertträgern und Platies nur 25 %.

Es war deshalb von Interesse, diese Untersuchungen auch auf die umstrittene Gattung Poecilia auszudehnen.

MATERIAL UND METHODEN

Xiphophorus maculatus Guenther *(= Platypoecilus maculatus)* und *Xiphophorus helleri helleri* Haeckel erhielten wir aus dem Genetischen Institut der Universität Giessen. Es handelt sich hier um die gleichen Stämme, die in früheren Arbeiten benutzt wurden und die an anderer Stelle ausführlich beschrieben sind (SCHOLL, 1973). Bei *Poecilia reticulata* Peters *(= Lebistes reticulatus)* standen uns fünfzehn Zuchtstämme verschiedenen Ursprungs von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung Neuherberg/München zur Verfügung. *Poecilia sphenops* Valenciennes *(= Mollienesia sphenops)* und *Poecilia vittata* Guichenot *(= Limia vittata)* wurden aus verschiedenen Zoologischen Handlungen Berns bezogen.

Wir verglichen die 6-Phosphogluconat Dehydrogenasen (6-PGD), die Indophenol Oxydasen (IO) und die jeweils von mehreren Loci codierten Isoenzyme der Laktat Dehydrogenasen (3 Loci: Ldh-1 = E_4-LDH, Ldh-2 = B_4-LDH und Ldh-3 = A_4-LDH), Malat Dehydrogenasen (2 Loci: Mdh-1 = A_2-MDH, Mdh-2 = B_2-MDH) und Isozitrat Dehydrogenasen (2 Loci: Idh-1 = Muskel-IDH, Idh-2 = Leber-IDH). Diese Enzyme wurden nach elektrophotetischer Auftrennung (vertikale Stärkegel-Elektrophorese) mitochondrienfreier Überstandsfraktionen von Gewebehomogenaten durch spezifische Färbemethoden auf den Gelen lokalisiert.

Die 6-PGD und die LDH-Isoenzyme wiesen wir in Augenhomogenaten nach, die MDH-Isoenzyme und die Muskel-IDH in Muskelhomogenaten, die Leber-IDH und die IO in Leberhomogenaten. Die Details der Elektrophorese und die spezifischen Enzymfärbungen wurden bereits ausführlich beschrieben (SCHOLL, 1973). Gegenüber früheren Untersuchungen ergaben sich folgende Modifikationen: IO wurde in einem Tris-Borat-EDTA-Puffer aufgetrennt (Gel- und Elektrodenpuffer 87 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 8.7 mM Borsäure, 1mM Äthylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz, Elektrophorese: 15 Std. bei 8 Volt/cm). Alle anderen Enzyme wurden in einem Tris-Zitrat-Puffer aufgetrennt (Elektrodenpuffer 135 mM Tris, 45 mM Zitronensäure, Gelpuffer 9 mM Tris,

3 mM Zitronensäure, Elektrophorese: 15 Std. bei 5 Volt/cm). Die Nachweislösung für Isozitrat Dehydrogenase enthielt in 50 ml 0.05 M Tris-Puffer, pH 8.5, 75 mg Na-Isozitrat, 10 mg NADP, 25 mg $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 10 mg Nitroblue Tetrazolium (NBT) und 2 mg Phenazin Methosulfat (PMS). Der Nachweis der Inophenoloxydase erfolgte in 50 ml Tris-Puffer, 0.2 M, pH 8.5, enthaltend 25 mg $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 5 mg NBT und 8 mg PMS. Bezüglich einer Wiedergabe von Zymogrammen und deren genetischer Interpretation verweisen wir auf eine kürzlich erfolgte ausführliche Publikation von elektrophoretischen Untersuchungen an Zahnkarpfen der Gattung *Xiphophorus* (Scholl, 1973).

Resultate und Diskussion

Die unter Standard-Versuchsbedingungen gemessenen elektrophoretischen Mobilitäten der einzelnen Enzyme sind in Tabelle I wiedergegeben. Diese Tabelle lässt erkennen, dass mehrere Enzyme bei allen Arten die gleiche Mobilität aufweisen, nämlich die E_4-LDH, die A_4-LDH (am Locus dieses Enzyms ist *P. sphenops* allerdings dimorph, das zweite Allel codiert für eine A_4-LDH mit kathodischer Mobilität) und die A_2-MDH. Bei allen anderen Enzymen bestehen wenigstens Unterschiede zwischen den Arten der Gattung *Poecilia* und der Gattung *Xiphophorus*. Aber innerhalb der Gattung *Poecilia* hat jedes andere Enzym bei mindestens zwei Arten jeweils die gleiche elektrophoretische Mobilität oder an den polymorphen Loci ist wenigstens ein Allel vorhanden, das auch bei einer anderen Art beobachtet wird. So weisen die B_4-LDH, die Muskel-IDH und die Leber-IDH bei *P. reticulata* und *P. vittata* die gleiche elektrophoretische Mobilität auf. Am Mdh-2 Locus sind alle drei *Poecilia*-Arten polymorph, aber bei *P. reticulata* wird ein Allel beobachtet, das auch bei *P. vittata* auftritt und das zweite Allel von *P. vittata* an diesem Locus wird auch bei *P. sphenops* festgestellt. Eine Ausnahme bildet lediglich die IO, die bei allen *Poecilia*-Arten trotz Polymorphismus artcharakteristische Mobilitäten aufweist.

Diese Beobachtungen deuten bereits einen hohen Grad genetischer Ähnlichkeit der Arten der beiden Gattungen an. Um die Arten in dieser Hinsicht besser vergleichen zu können, haben wir aus den erhaltenen Messdaten Koeffizienten genetischer Ähnlichkeit errechnet, die für jedes verglichene Artenpaar den mittleren Anteil nicht unterscheidbarer Allele angeben (Tab. II). Sofern sich eine Art an einem Enzymlocus als polymorph erwies, legten wir der Berechnung der Ähnlichkeitskoeffizienten gleiche Häufigkeiten aller beobachteten Allele zugrunde. Diese hypothetische Annahme statt der von uns beobachteten Allelhäufigkeiten schien uns sinnvoll, weil in unserem Untersuchungsmaterial andere Allelverteilungen möglich sind als in Wildpopulationen. Durch diese Annahme erhalten die berechneten Ähnlichkeitskoeffizienten zwar eine gewisse Unschärfe, die jedoch unsere prinzipiellen Feststellungen nicht berührt.

Tabelle I

Elektrophoretische Mobilitäten (in cm unter Standard-Versuchsbedingungen) verschiedener Enzyme bei Zahnkarpfenarten. Die Messungen basieren auf direkten Vergleichen von Tieren aller fünf Arten auf einem Gel. Sofern für ein Enzym bei einer Art mehrere Mobilitäten angegeben sind, betrifft dies polymorphe Loci.

Locus	Enzym	P. reticulata	P. sphenops	P. vittata	X. maculatus	X. helleri helleri
Ldh-1	E_4-LDH	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6
Ldh-2	B_4-LDH	—	—	—	2.3	2.3
		—	2.6	—	—	—
		3.6	3.6	3.6	—	—
Ldh-3	A_4-LDH	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
		—	—0.7	—	—	—
Mdh-1	A_2-MDH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
Mdh-2	B_2-MDH	—	1.4	—	—	—
		2.1	—	2.1	—	—
		—	2.3	2.3		
		—	—	—	2.7	2.7
		3.4	—	—	—	—
Idh-1	Muskel-IDH	2.4	—	2.4	—	—
		—	3.0	—	—	—
		—	—	—	3.2	3.2
Idh-2	Leber-IDH	—	—	—	—	2.5
		4.2	—	4.2	4.2	—
		—	4.7	—	—	—
		—	5.3	—	—	—
		—	5.6	—	—	—
Io	IO	—	1.2	—	—	—
		—	—	2.5	2.5	2.5
		2.8	—	—	—	—
		—	3.0	—	—	—
		4.1	—	—	—	—
6-Pgd	6-PGD	—	—	—	3.3	—
		—	—	—	—	3.8
		4.2	—	—	—	—
		—	4.6	4.6	—	—
		—	5.4	—	—	—

Tabelle II

Koeffizienten genetischer Ähnlichkeit bei Zahnkarpfen der Gattungen Poecilia *und* Xiphophorus. *Berechnet aufgrund des Anteils elektrophoretisch nicht unterscheidbarer homologer Enzyme (siehe Tabelle I). Die umrandeten Zahlen stellen Mittelwerte der intra- resp. intergenerischen Artenpaare dar.*

	P. reticulata	P. sphenops	P. vittata	X. maculatus	X. helleri helleri
Poecilia reticulata (= Lebistes reticulatus)	—	0.33	0.72	0.44	0.33
		[0.50]			
P. sphenops (= Mollienesia sphenops)		—	0.44	0.28 [0.39]	0.28
P. vittata (= Limia vittata)			—	0.56	0.44
Xiphophorus maculatus (= Platypoecilus maculatus)				—	0.78
X. helleri helleri					—

Wie aus Tabelle II ersichtlich ist, finden wir zwischen den drei *Poecilia*-Arten zwar sehr unterschiedliche Ähnlichkeitskoeffizienten, aber die Grössenordnung auch des niedrigen Koeffizienten zwischen *P. reticulata* und *P. sphenops* liegt noch im Streuungsbereich der Werte, die andere Autoren bei anderen congenerischen Spezies beobachtet haben (Avise und Selander, 1972). Somit besteht aus biochemisch-genetischer Sicht zunächst kein Anlass, die Revision der Systematik der Zahnkarpfen (Rosen und Bailey, 1963) anzufechten und für eine Beibehaltung der früheren Gattungsnamen zu plädieren.

Bemerkenswert sind aber vor allem die hohen Ähnlichkeitskoeffizienten zwischen den *Poecilia*- und *Xiphophorus*-Arten. Für unser Material ergibt sich zwischen den Gattungen *Poecilia* und *Xiphophorus* ein mittlerer Ähnlichkeitskoeffizient von 0.39. Dies bedeutet, dass beim Vergleich zweier Individuen der beiden Gattungen im Durchschnitt vier von zehn Proteinen elektrophoretisch identisch sind, während sonst jenseits der Gattungsgrenzen gleiche Mobilitäten homologer Enzyme äusserst selten sind (Johnson und Selander, 1971; Hubby und Throckmorton, 1968). Insbesondere fällt auf, dass die Ähnlichkeitskoeffizienten für die *inter*generischen Paare *vittata- maculatus* und *reticulata-maculatus* grösser sind als der Koeffizient für das *intra*generische Paar *reticulata-sphenops*. Diese hohen Ähnlichkeitskoefflzienten können kaum zufällig sein, d.h. bedingt durch die geringe Zahl untersuchter Enzyme oder durch die Un-

kenntnis der Allelenverteilung an polymorphen Enzymloci in Wildpopulationen. Sie müssen vielmehr als ein Indiz dafür gewertet werden, dass zwischen den Zahnkarpfengattungen *Poecilia* und *Xiphophorus* nur eine relativ geringe genetische Differenzierung stattgefunden hat und dass auch der Grad der Verschiedenheit zwischen Arten derselben Gattung nicht wesentlich geringer ist als zwischen Arten, die verschiedenen Gattungen (*Poecilia* und *Xiphophorus*) angehören. Sie regen weitere Untersuchungen an, wobei besonders die Frage zu prüfen ist, ob nicht mit dem gleichen Recht, mit dem die alten Gattungen *Lebistes*, *Limia* und *Mollienesia* zur neuen Gattung *Poecilia* und die alten Gattungen *Platypoecilus* und *Xiphophorus* zur neuen Gattung *Xiphophorus* vereinigt wurden, auch die neuen Gattungen *Poecilia* und *Xiphophorus* zusammengefasst werden könnten.

Es bestehen natürlich kaum Zweifel, dass keine andere systematische Kategorie so schwer objektiv zu umschreiben ist wie gerade die Kategorie der Gattung. Aber in diesem Zusammenhang sollte die besondere Bedeutung der biochemisch-genetischen Methoden beachtet werden, die es gestatten, homologe Genloci auch jenseits der Artgrenzen, d.h. jenseits der Möglichkeiten des Allelietests durch Artkreuzungen, zu vergleichen und das Ausmass der genetischen Differenzierung quantitativ zu erfassen. Allerdings soll das nicht heissen, dass die Abgrenzung von Gattungen bevorzugt nach solchen quantifizierbaren biochemischen Merkmalen erfolgen sollte. Vielmehr sind wir der Ansicht, dass biochemische Merkmale nur zusammen mit morphologischen, physiologischen und ethologischen Merkmalen zur Beurteilung systematischer Kategorien herangezogen werden dürfen, zumal sich heute noch nicht abschliessend beurteilen lässt, ob mit den Proteinloci tatsächlich repräsentative Stichproben des Genoms erfasst werden können und ob eine Speziation in der Regel von einer so tiefgreifenden Reorganisation des genetischen Pools begleitet ist, wie es bisher durch biochemisch-genetische Untersuchungen vor allem bei Insekten (Ayala *et al.*, 1970) und Landwirbeltieren (Johnson und Selander, 1971) gezeigt wurde.

Zusammenfassung

Der Grad der genetischen Differenzierung verschiedener Zahnkarpfenarten der Gattungen *Poecilia* und *Xiphophorus* wird aufgrund des Anteils elektrophoretisch unterscheidbarer homologer Enzymproteine erfasst. Innerhalb der Gattung *Poecilia* werden zwar sehr unterschiedliche Koeffizienten genetischer Ähnlichkeit festgestellt, die aber im Bereich der Variationsbreite der Werte liegen, die bei anderen congenerischen Spezies beobachtet wurden. Bemerkenswert ist ein auffallend geringer Grad genetischer Differenzierung zwischen den beiden Gattungen. Dieser Befund wird unter systematischen und evolutionsbiologischen Gesichtspunkten diskutiert.

LITERATUR

AVISE, J. C. and R. K. SELANDER. 1972. Evolutionary genetics of cave-dwelling fishes of the genus *Astyanax*. *Evolution* 26: 1-19.

AYALA, F. J., C. A. MOURÃO, S. PÉREZ-SALAS, R. RICHMOND and Th. DOBZHANSKY. 1970. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. I. Genetic differentiation among sibling species. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 67: 225-232.

HUBBY, J. L. and L. H. THROCKMORTON. 1968. Protein differences in *Drosophila*. IV. A study of sibling species. *Amer. Nat.* 102: 193-205.

JOHNSON, W. E. and R. K. SELANDER. 1971. Protein variation and systematics in the kangaroo rats (genus *Dipodomys*). *Syst. Zool.* 20: 377-405.

KOSSWIG, C. 1973. The role of fish in research on genetics and evolution. In: Genetics and mutagenesis of fish. *J. H. Schröder, editor. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.*

ROSEN, D. E. and R. M. BAILEY. 1963. The poeciliid fishes (Cyprinodontiformes), their structure, zoogeography, and systematics. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 126: 1-176.

SCHOLL, A. 1973. Biochemical evolution in the genus *Xiphophorus*. In: Genetics and mutagenesis of fish. J. H. SCHRÖDER, editor. *Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.*

SCHOLL, A. and F. ANDERS. 1973. Electrophoretic variation of enzyme proteins in Platyfish and Swordtails (Poeciliidae, Teleostei). *Archiv für Genetik 46* 121-129.

SCHRÖDER, J. H. 1969. Anmerkungen zur systematischen Revision der Gattungen *Mollienesia*, *Lebistes* und *Limia*. *Monatsschrift für Ornithologie und Vivarienkunde* 16: 410-412.

ZANDER, C. D. 1967. Ökologische und morphologische Beiträge zur Systematik und geographischen Verbreitung der Gattung *Xiphophorus* (Pisces). *Mitt. Hamburg. Zool. Mus. Inst.* 64: 87-125.